

⑫ 公表特許公報(A)

平5-501399

⑬ 公表 平成5年(1993)3月18日

⑭ Int. Cl.³

A 61 K 39/395

⑮ 識別記号

ADZ D
U

⑯ 庁内整理番号

8413-4C
8413-4C

⑰ 審査請求 未請求

予備審査請求 有

⑱ 部門(区分) 3(2)

(全 14 頁)

⑲ 発明の名称 敗血症の症状を治療する方法および組成物

⑳ 特 願 平2-511133

㉑ 出 願 平2(1990)7月30日

㉒ 翻訳文提出日 平4(1992)1月31日

㉓ 国際出願 PCT/US90/04250

㉔ 国際公開番号 WO91/01839

㉕ 国際公開日 平3(1991)2月21日

㉖ 優先権主張 ㉗ 1989年8月1日 ㉘ 米国(US) ㉙ 387,817

㉚ 発 明 者 ウレヴィツチ リチャード アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92014 デル マー ダ ク
チヤラ 1127

㉛ 出 願 人 スクリップス クリニック ア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース
ンド リサーチ ファウンダー トーリー バインス ロード 10666
シオン

㉜ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外 6 名

㉝ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

最終頁に続く

特許(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 治療効果量の抗CD14抗体を患者に投与することを含む敗血症の治療方法。
2. 前記抗CD14抗体がリボ多量リボ多量結合たんぱく質複合体のCD14への結合を阻害するモノクローナル抗体である請求項1記載の方法。
3. 前記モノクローナル抗体がハイブリドーマATCCT1B22Bまたはその抗CD14抗体分子発現細胞によって生産される請求項2記載の方法。
4. 前記モノクローナル抗体が抗CD14抗体分子の下(a b')部分を含む請求項2記載の方法。
5. 前記治療効果量が1日より体重1キログラム当たり0.1乃至20ミリグラムである請求項2記載の方法。
6. 前記方法がさらに実質的に殺菌量の抗生物質を前記患者に投与することを含む請求項1記載の方法。
7. 前記抗生物質がグラム陰性菌に対して有効な抗菌剤である請求項6記載の方法。
8. 前記敗血症がグラム陰性菌の感染に由来する請求項1記載の方法。
9. 前記敗血症がウイルス、グラム陰性菌または菌類の感染に由来する請求項1記載の方法。
10. 前記方法がさらに実質的に同時にTNF血中濃度減少量の抗TNF抗体を前記患者に投与することを含む請求項1記載の方法。
11. 前記方法がさらに前記抗CD14抗体と実質的に同時に殺菌量の抗生物質を前記患者に投与することを含む請求項10記載の方法。
12. 前記患者が以下に示す症状: 成人呼吸器不全、分散性血管内凝血、腎臓疾患および肝臓疾患のうちの1つ以上の症状を示す請求項1記載の方法。
13. 前記敗血症が化学的または物理的外傷に由来する請求項1記載の方法。
14. 患者の内臓系血症の症状の改善方法で、該患者に単球マクロファージ系統細胞によるリボ多量リボ多量結合たんぱく質複合体のCD14への結合を阻害することを含む方法。
15. 前記抗CD14抗体がリボ多量リボ多量結合たんぱく質複合体のCD14への結合を競争的に阻害するモノクローナル抗体である請求項14記載の方法。

16. 前記モノクローナル抗体がハイブリドーマATCCT1B22Bまたはその抗CD14抗体分子発現細胞から生産される請求項15記載の方法。
17. 患者の敗血症の治療方法で、該患者に治療効果量の抗リボ多量リボ多量結合たんぱく質抗体を投与することを含む方法。
18. 患者の敗血症の治療方法で、該患者に治療効果量の抗リボ多量リボ多量結合たんぱく質のペプチドアナログを投与することを含む方法。
19. 前記ペプチドアナログが以下の式:

CNRCNRAFPQDELY,
YTTPEPSELDDDDPRC、または
KRVDADADPRQYADTC.

で置換されるアミノ酸配列を有する請求項16記載の方法。

20. 医薬的に許容可能な賦形剤中、LPS-LBP複合体のCD14への結合を阻止し得る抗CD14抗体分子を含む単位投与量の治療組成物。
21. 請求項20記載の組成物で、さらに単位投与量の抗TNF抗体分子を含む組成物。
22. 請求項20記載の組成物で、さらに殺菌量の抗生物質を含む組成物。
23. 請求項21記載の組成物で、さらに殺菌量の抗生物質を含む組成物。
24. 活性成分として敗血症の治療のためにヒトに投与するのに適した濃度の、LPS-LBP複合体のCD14への結合を阻止し得る抗CD14抗体分子ならびに、抗生物質および抗TNF抗体分子のうちの1つまたは両方を含む組成物。

(製造技術)

本発明は敗血症の予防または治療に関する方法および組成物に関する。特に本発明はCD14単球分化抗原またはLPS-LBP複合体に結合し、そのことによってCD14発現細胞によるLPS-LBP複合体の結合を阻止する分子に関する。

(背景)

敗血症はトキシンによって誘発される病気で、そのトキシンは一般に感染や外傷によって誘発または悪化される。一般に敗血症の初期症状には悪寒、多量の汗、異常な発熱、衰弱などがあり、引きついで恒常的発熱、ショックを起す低血圧、好中球減少症、白血球減少症、分散性血管内凝血、成人呼吸器症候群および多臓器障害などが起こる。

敗血症誘発トキシンは病原性バクテリア、ウイルス、植物および毒菌と関連していることが分っている。バクテリアトキシンの中でよく分かっているものにグラム陰性菌のエンドトキシンまたはリポ多糖(LPS)がある。これらの分子は全てのグラム陰性菌の外膜に存在する糖脂質である。ほとんどのLPS分子の化学構造は複雑かつ多様であるが、その一般的特徴にはLPSのリポD領域がある(リーシエル(Rietschel)、E. Th. 等、"エンドトキシンハンドブック"、1:187-214、R. M. プロクター(Proctor)およびE. Th. ソーシエル(Rietschel)編、エルスピア、アムステルダム(1984))。生体系におけるリポDの認識が全てではないにしろ多くの敗血症の病理生理学的変化を開始させる。

現在、宿主(ヒトを含む)のLPSへの一次応答が単球/マクロファージ系統の細胞によるLPSの認識と関連し、ついで一般にサイトカインと呼ばれている物質を含む多くの細胞産物の急速な生成が起こるという主張が支持されている。

敗血症、特にLPSへの応答に関連すると考えられている他の細胞には多形核白血球および内皮細胞がある。

これらの細胞もLPSに反応し強力な炎症物質を生成し得る。

特に成人呼吸器症候群(ARDS)の場合、LPSがグラム陰性敗血症におけ

ウエイズ(Welsh)等、J. Immunol. 132:3109-3115(1984)。BPIとは対照的に、LBPはグラム陰性菌に対して直接的細胞毒性を示さず[トビアス(Tobias)等、J. Biol. Chem. 263:13479-13481(1988)]その詳細な機能は不明である。

その他の背景として、単球/マクロファージ系統の細胞は微生物の食作用、抗原物質の取り込みおよびヘルパーT細胞を刺激する形態の提示などを含む多様な免疫機能を行う。おそらくこれらも腫瘍に対する免疫探索に関係しており、ある種の構成分成分やサイトカインを分泌している。表面膜抗原はこれらの活性を調節する上で重要な働きをしている。いくつかの単球/マクロファージ表面抗原が同定され、それらの分子量が決定された。これらの抗原の1つであるCD14は単球、マクロファージおよび活性化顆粒球が発現する55KDの糖たんぱく質である。これはMO2、MY4、3C10およびLEUM3を含む多くのモノクローナル抗体(mAb)で認識される。CD14の生物学的機能は分かっていないが、成熟細胞におけるその制限的発現は重要なエフェクター機能を暗示している。単球細胞表面分化抗原CD14をコードする遺伝子のクローニングが決定され、それからCD14の7ミウ領域基配列が同定された。(フェレロ(Ferrero)等、Nucleic Acids Research, Vol. 16:4173(1988))

(発明の概要)

本発明はサイトカインの生産および放出の基本的レギュレーターは、特に単球/マクロファージ系統の細胞の場合、CD14レセプターであるという発見から産まれた。サイトカインの分泌が敗血症の症状の発現に重要な役割を果たしていることから本発明はサイトカイン、特にTNFの分泌を阻止する方法および試薬に関する。

それゆえ、ある態様において本発明は敗血症の危険にある患者に治療効果量の抗CD14抗体、抗LBP抗体、LBPペプチドアナログもしくはこれらの複合物を好ましくは静脈注射で投与することに関する。この方法は単独、もしくは抗生物質、ステロイド、抗TNF抗体、TNFアンタゴニストなど1つ以上の試薬で治療することを含む敗血症の症状を阻止または軽減することが知られている他の治療法と組合せて使用できる。

るヒトの死亡の原因となると信じられている。ヴァンデベンター(van Deventer)等、Lancet、1:805(1988)、ジューラー(Ziegler)等、J. Infect. Dis. 158:19-28(1987)。たとえば最近、特定のサイトカイン、腫瘍壊死因子アルファ/カテクチン(TNF)は敗血症ショックの一次仲介物であると報告されている。

ビュートラー(Beutler)等、N. Eng. J. Med. 318:879(1987)

実験動物やヒトへのバクテリア由来LPSエンドトキシンの静脈注射がTNFの急速かつ一時的放出が起こる。ビュートラー(Beutler)等、J. Immunol. 135:3972(1985)。マチソン(Mathison)等、J. Clin. Invest. 81:1925(1988)。TNFが敗血症ショックの重要な仲介物であるという証拠は基本的に抗TNF抗体による動物の前処置が死亡率を減らすという実験から得られた。ビュートラー(Beutler)等、Science 229:868(1985)、マチソン(Mathison)等、J. Clin. Invest. 81:1925(1988)。これらの報告はLPSまたは他の因子によって引き起こされるTNFの分泌が敗血症の致命的症状を軽減することを示している。

血液にLPSを導入すると、それがリポ多糖結合たんぱく質(LBP)と呼ばれるたんぱく質と結合する。LBPは健康なヒトや動物の血清中に100ng/ml程度の濃度で存在する60KDの糖たんぱく質である。

急性状態の場合、LBPは肝細胞で合成され、血清中の濃度は30-50μg/mlに達する。LBPは急性状態のヒトやウサギの血清から精製できる。トビアス(Tobias)等、J. Exp. Med. 164:777-788(1986)。LBPはLPSのリポD領域を認識し、ラフおよびスムース両型のLPSと高アフィニティな1:1の化学量論的複合体を形成する。トビアス(Tobias)等、J. Biol. Chem. 263:10867-10871(1988)。LBPは殺菌性透過促進因子(BPI)として知られているLPS結合たんぱく質とホモロジーを持つN末端配列を有している。トビアス(Tobias)等、J. Biol. Chem. 263:13479-13481(1988)。BPIはPMNの特定の顆粒中に保存されており(クエイ(Quay)等、Blood、69:852-859(1987))、LPSに結合しその透過性バリアーを破壊することによりグラム陰性菌を殺す。

さらに本発明は敗血症の症状を阻止または軽減するのに有用な典型的には単位投与量形の治療組成物に関する。この組成物には活性成分として抗CD14抗体、抗LBP抗体およびLBPアンタゴニストとして働くLBPペプチドアナログを1つ以上含む医薬的に許容し得るキャリアーが含まれる。好ましい態様において本発明の治療組成物にはさらに活性成分として抗生物質、ステロイド、抗TNF抗体、TNFアンタゴニスト、可溶性CD14など敗血症の症状を阻止または軽減することが知られている試薬を単独または複合物の形で含まれる。

(図面の簡単な説明)

図面は本発明の公開の一部を構成する。

第1図はLBPがELPSとMOとの相互作用を促進することを示している。単一のMOを様々な量のLBP存在下またはELPS¹¹とインキュベートしその吸着指数を測定した。コントロールとしての急性状態たんぱく質、マンノース結合たんぱく質(MBP)(5μg/ml)はELPS¹¹の結合を促進しなかった(吸着指数4.9)。

これらの結果は4回の別個の実験における代表的なものである。

第2図はELPSのMOへのLBP依存性結合がELPS中のLPSの密度に依存することを示している。ELPSを様々な量のLPSで調製し、5μg/ml LBPの存在下、または非存在下単一のMOとインキュベートした。それらの結果は4回の別個の実験における代表的なものである。

第3図はMOがLPS非存在下ではLBPを認識しないことを示している。ピオチンおよびストレプトアビジンでコートしたE(BAV)をピオチン化LBPとインキュベーションしてELBPを生成させた。ELBPおよびEBAVの両方を37℃で20分間様々な量のLPSとインキュベートし、洗浄後単層のMOへの結合を測定した。

第4図はLBPがFc仲介作用を促進することを示している。単層のMO(5日間培養)を様々な量の抗E-1gGの存在下、45分間E、ELBPまたはEC3b1とインキュベートした。Eの食作用は材料の方法のセクションで説明する方法で測定した。ELBPはMOとのインキュベーションの際にELPS¹¹に1μg/mlのLBPを添加することにより得られた(0.3μg

LPS/ 3×10^4 E)。抗E IgGの非存在下におけるEの吸着は以下のとおりであった：E、吸着指数(AI) - O: EC3b1, AI - 417; E LBP, AI - 404。これらの結果は4回の異なる実験における代表的なものである。

第5図はリガンドコート表面にMOを吸着する際の過酸化水素の分泌を示している。 3×10^4 個のMO(3日間培養)をコートしたマイクロプレートのウェルに添加し、同時に過酸化水素の発生を測定した。過酸化水の持続的な生成は免疫複合体(HSA-抗HSA、黒丸)上へのプレーティングまたは可溶性アグニストPMAに反応して(黒ダイヤモンド)起こった。LPSコート化表面との相互作用の際には低い再現性のある過酸化水の放出が観察された(白三角)。しかし、LBPコート化表面へのプレーティングの場合放出は起こらず(白四角)、またLPSコート化表面へのLBPのコーティングはLPSにより誘導される過酸化水の生成が阻害された(白ダイヤモンド)。LBPコート化ウェル中のMOはPMAに反応した正常な過酸化水の発生を示すことからLBPが過酸化水の生成や測定を妨害することはなかった。

第6図はモノクローナル抗CD14抗体によるLPS-LBP複合体結合の阻害を示している。単層のヒトMOを0℃で15分間指示温度のモノクローナル抗体とインキュベートした。LPSとLBPで順次コートした赤血球を添加し、その吸着を測定した。これらの結果は3回の別々の投与応答実験および固定濃度の抗体を用いて行った10回の異なる実験における代表的なものである。マクロファージ上の決定基に対する多くの高濃度のmAbはELBPの結合に与える影響も示さなかった。

第7図は表面に結合した抗CD14 mAbがLBP-LPS複合体の結合を低減することを示している。単層のヒトマクロファージを指示モノクローナル抗体 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ でコートした基質に定着させた。この細胞を洗浄後ELPS'を添加し、その吸着を測定した。

第8図はLPSがTNF生産を誘導するのにLBPが必要とされることを示している。ウサギの腹腔液マクロファージ(PBM)に指示濃度のLBP(LBP)加熱(変性)LBP、ウシ血清アルブミン(BSA)またはウシ胎児血清(FCS)の存在下LPSを作用させた。

S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	スレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リジン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
W	Try	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システイン

全てのアミノ酸配列は左から右にアミノ末端からカルボキシ末端の方法で示されている。さらにアミノ酸配列の始めまたは終りにあるダッシュはさらに1つ以上のアミノ酸残基配列につづくペプチド結合を示している。

種々の文法上の「抗体」という言葉は免疫グロブリン分子および、または免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち抗体結合部位またはパラトープを含む分子を含む組成物を意味する。

好ましい態様において使用される抗体はアフィニティー増強したものである。

「抗体結合部位」とは抗原を特異的に結合する重鎖および軽鎖の可変および超可変部からなる抗体分子の構造部分である。

種々の文法上の「抗体分子」という語句は本来の免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な領域の両方を示している。

代表的抗体分子には本来の免疫グロブリン分子、実質的免疫グロブリン分子および部分で Fab、Fab'、F(ab')₂ および F(y) として知られている領域を

そのPEMによって生産されるTNF量を測定した。

第9図はLBPのトリプシン消化に対する感受性をそれが結合するリガンド、すなわちRe 55 LPSの存在下または非存在下の条件下で示している。分子量マーカー(ファルマシア、ビスカタウェイ、N. J.; カタログNo. 17-0448-01; 94キロダルトン(KD)のホスホリラーゼB、87KDのウシ血清アルブミン、43KDのオвалブミン、30KDのカルボニックアンハイドラーゼ、20.1KDの大豆トリプシンインヒビターおよび14.4KDのアルファラクトアルブミン)をLBPを含むレーンの隣りに示した。これらの結果はLPSへのLBPの結合はLBPの構造変化を生じ、このことはLPS-LBP複合体の一部として存在するときのみCD14を結合する能力を説明することを示している。

(発明の詳細な説明)

A. 定義

アミノ酸残基：ここで述べられているアミノ酸残基はL型のものが好ましい。しかし、そのポリペプチドが免疫グロブリン結合の望ましい機能を維持するかぎりD型残基でL型アミノ酸残基で置換し得る。NH₂はポリペプチドのアミノ末端に存在するフリーのアミノ基を意味する。COOHはポリペプチドのカルボキシ末端に存在するフリーのカルボキシ基を示す。標準的ポリペプチド命名法：J. Biol. Chem. 243: 3552-358 (1968)に従ってアミノ酸残基の略号を以下の対応表に示す。

記号	対応表	
	(1文字)	(3文字)
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン

含むパラトープを有する免疫グロブリンの一部がある。これらの免疫グロブリンの一部は本発明に有用である。

抗体分子の Fab および F(ab')₂ 部分は自分自身でよく知られている方法により実質的免疫グロブリンを各々バインおよびペプシンでたんぱく質分解することにより得られる。たとえば米国特許No. 3,425,558、セオフィロポラス(Theo filopoulos) 等(本明細書では参考として引用している)参照。Fab' 抗体分子部分はよく知られており、2つの重鎖部を結合するジスルフィド結合をメルカプトエタノールで還元し、生成したたんぱく質メルカプタンをヨードアセトアミドなどの試薬でアルキル化することにより F(ab')₂ 部分から生成する。本来の抗体分子を含む抗体が好ましく、例にはこれが使用される。

種々の文法上の「モノクローナル抗体」という語句は特定の抗原と免疫反応し得る唯一種の抗体結合部位を有する抗体を示す。一般にモノクローナル抗体は免疫反応する抗原に対して単一の結合アフィニティーを示す。それゆえモノクローナル抗体には各々異なる抗原に対して免疫特異的な抗体結合部位を多数含む抗体、たとえば二特異的(キメラ)モノクローナル抗体が含まれる。

「実質的に同時」という語句は同時発生的結果、たとえば抗生物質投与と抗CD14抗体、抗LBP抗体、LBPペプチドアナログ、またはこれらの組合せ物の投与の結果として起こる敗血症の症状の軽減または予防などを生じるのに十分な時間以内を意味する。

「医薬的に許容し得る」という語句は生理的に許容し得る、かつヒトに投与した場合の副作用、めまいなどアレルギーまたは不都合な反応を起こさない分子または組成物に対して使用される。

B. 治療法

本発明は敗血症の1つ以上の症状、特に発熱、低血圧、好中球減少症、白血球減少症、赤血球減少症、ショックおよび多臓器疾患などTNFの血中レベルの時間増加に関連する症状の治療および、または予防に関する。このような治療を必要とする患者にはグラム陰性菌感染、ヘビ毒中毒、肝臓疾患などから生じるエンドトクセミアなどトクセミアの危機にある患者が含まれる。さらに、グラム陽性菌、ウイルスまたは菌類感染した患者も敗血症の症状を示し、本発明の治療の

対象となる。特に本発明から患者を救済するには大腸菌、ヘモフィラスインフルエンザB (*Haemophilus influenza B*)、ナイセリア meningitidis (*Neisseria meningitidis*)、スタフィロコッカス (*Staphylococci*) またはニューモコッカス (*pneumococci*) に感染した患者がある。敗血症の危機にある患者には、火傷、鋭による負傷、化学物質による中毒や乱用による腎臓または肝臓障害をもつ患者も含まれる。

したがってある態様では本発明は治療を必要とする患者に治療効果量の抗CD14抗体を投与することにより敗血症の1つ以上の症状を軽減する方法に関する。

“治療効果量”という語句はTNFの血漿レベルの臨床的に有意な上昇を防ぎ、好ましくは少なくとも約30パーセント、より好ましくは少なくとも約50パーセント、最も好ましくは少なくとも約90パーセント減少させるのに十分な量を意味している。活性成分として用いる試薬の好ましい治療効果量にはセクションCで述べられるものが含まれる。

TNFの血漿レベルの臨床的に有意な上昇は少なくとも約25 pg/mlまでの上昇である。血漿TNFレベルの測定法は当分野でよく知られており、ここでは特に好ましい方法について説明する。

健康人または正常な実験動物のTNFレベルはせいぜい約10 pg/mlと見做られ、この値はTNFの最も感度の高い検定法の検出限界である。ミシー(Mitchie)等、*New Eng. J. Med.* 318:1481-1486 (1988)；マチソン(Matthiesson)等、*J. Clin. Invest.* 81:1925 (1988) およびワーズ(Wage)等、*Lancet*, 1:355-357 (1987)。LPSで処理した後のTNFレベルは20倍上昇して400 pg/mlまで増加することが示された。最近、グラム陰性LPS含有メニンゴコッカスバクテリアに感染した場合の致死症と血清TNFレベルの強い相関関係が示された。ワーズ(Wage)等、*Lancet*, 1:355-357 (1987)。さらに重症度の敗血症モデルでTNFの同様の増加が示され、これらの変化は致死と直接関係していた。

トレーシー(Tracey)等、*Nature*, 330:882-884 (1987)。

別の態様においてこの方法には敗血症の危機にあり治療を必要とする患者に治療効果量の抗CD14抗体を、好ましくは単球/マイクロファージ系統、好ましくは

くは単球由来のマイクロファージ細胞などの細胞によるインビボにおけるLPS誘導型のTNF分泌を阻止するのに十分な量の抗CD14抗体を投与することが含まれる。

本発明の治療法で使用する抗CD14抗体はアフィニティー精製したポリクローナル抗体であることが好ましい。さらにこの抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。さらにここで用いる抗体CD14抗体分子は抗体分子の Fab、Fab'、Fc(ab')₂、またはFc(v)部分であることが好ましい。

本発明を実施するのに有用なモノクローナル抗体はアシュマン(Ashman)等(*Blood*, 69:886-892 (1987)) によって報告された60bおよびバンブーリス(Van Voorhis) 等(*J. Exp. Med.*, 158:126-145 (1983)) によって報告されている3C10 (アメリカンタイプカルチャーコレクション登録番号TIB22B、ロックビル、MD) などのハイブリドーマによって生成されるものが好ましい。mAb 60bおよび3C10はハイブリドーマ培養で生成できるが、本発明はこれに限定されるものではない。また本発明は60bおよび、または3C10などのハイブリドーマからクローン化される抗CD14免疫グロブリン発現細胞によって生成するmAbの使用に関する。すなわち、ハイブリドーマ3C10などによって分泌される抗CD14抗体分子を発見する技術は他の細胞系に準じてトランスフォーマントを生成し得る。このトランスフォーマントは遺伝子型的に本来のハイブリドーマとは異なるが、そのハイブリドーマによって分泌されるものに対応する抗体分子の免疫学的に所性なフラグメントを含む抗CD14抗体分子を生成し得る。たとえばリーディング(Reading)の米国特許4,642,334；ロビンソン(Robinson) 等のPCT刊行物WO 890099；ウィンター(Winter) 等のヨーロッパ特許0,289,400、キャビリー(Cabilly) 等、ヨーロッパ特許0,125,023参照。

モノクローナル抗体は上述のハイブリドーマによって生成されるものと同じCD14に対する免疫反応性を示すことが望ましい。ここで用いているように、種々の文法型の“免疫反応性”という言葉は所定量の抗体および所定量のCD14抗原間の免疫反応を50%阻害するのに必要な抗原濃度を示している。すなわち、免疫反応性とは、B/B₀値0.5を達成するのに必要な抗原濃度であ

る(ここでB₀は競合する抗原存在下で結合する抗体の最高量であり、Bは競合抗原存在下の結合する抗体量である。B₀およびBはバックグラウンドに同じ補正したものである)。ロバード(Robert)、*Clin. Chem.* 20:1255-1270(1974)参照。

別の態様において、本発明の治療法には治療効果量の抗LBP抗体、好ましくはアフィニティー精製したポリクローナル抗体、より好ましくはmAbを投与することが含まれる。さらに、ここで用いられる抗LBP抗体分子は抗体分子全体のうちの Fab、Fab'、Fc(ab')₂、またはFc(v) 部分の形であることが望ましい。投与する抗LBP抗体量は少なくとも敗血症の症状の1つを示す患者のTNFの血中レベルのLBP-LPS複合体によって誘導される臨床的に有意な増加を少なくとも約30パーセント、好ましくは少なくとも約80パーセント減少させるのに十分な量であることが好ましい。先に議論したように本発明の患者を救済する患者にはグラム陰性菌感染の結果内毒素血症を被った患者である。LBPを単離し、抗LBP抗体を誘導する方法は当分野でよく知られている。たとえばトビアス(Tobias)等、*J. Exp. Med.* 164:777-793 (1986) 参照。CD14に対するLBP-LPS複合体の結合を阻害し、それによりLBP誘導型のTNF分泌を阻害する抗LBP抗体の能力を測定し、かつ最適化する方法は当分野でよく知られている。たとえば、実施例16で示した検定法において抗CD14の代りに抗LBP抗体を用いることができる。

本発明を実施するのに有用な抗LBP抗体はLBPのペプチドアナログと免疫学的に交叉反応する。“LBPペプチドアナログ”とは単球由来のマイクロファージの表面に発現するCD14へのLPS-LBP複合体の結合を競争的に阻害し得るポリペプチドである。好ましいLBPペプチドアナログを第1表に示す。

第1表

名 称	アミノ酸配列
C18Y	CNRLNRPQPDELY
Y18C	YTTPEPSELDDDFRC
K16C	KRVDAADAPRQYADTC

ポリクローナル抗ポリペプチド抗体の生成法は当分野でよく知られている。キスター(Kister)等、米国特許4,493,795参照。一般に有用な抗体分子の Fab および、またはFc(ab')₂部分を含むモノクローナル抗体はここで参考として引用している“抗体、ラポラトリマニアル”ハロー(Harrow) およびレーン(Lane) 等、コールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク(1988)に述べられているハイブリドーマ技術で調製し得る。簡単に云うと、そのモノクローナル抗体組成物を生成するハイブリドーマを形成するためミエローマまたは他の自己複製細胞系をCD14またはそのLBP結合部分、またはLBPまたはそのCD14結合部分で高度免疫化した哺乳動物の脾臓から得られるリンパ球と融合する。

このミエローマ細胞系はリンパ球と同じ種由来のものが好ましい。一般的に、マウス129GIX⁺ 株が好ましい。本発明に使用するために適したマウスミエローマには各々名称CRL1580およびCRL1581でアメリカンタイプカルチャーコレクション、ロックビル、MDから入手し得るトピキサンチン-アミノグチリン-チミン感受性(HAT) 細胞系P3×63-Ag8.653およびSp2/0-Ag14がある。

一般に脾細胞はポリエチレングリコール(PEG) 6000を用いてミエローマ細胞と融合する。融合したハイブリドーマはHATに対する感受性で選択する。本発明を実施する上で有用なモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマは実施例18に示した方法でCD14またはLBPと免疫反応する能力およびLPS誘導型TNF分泌を阻害する能力を見極めることで同定する。

本発明で使用するのに有用なモノクローナル抗体は適当な抗原特性を有する抗体分子を分泌するハイブリドーマを含む培養地からなるモノクローナルハイブリドーマ培養を行なうことで生成し得る。この培養をそのハイブリドーマが培養中に抗体分子を分泌する条件および十分な時間維持する。この抗体含有培養地を回収し、その中に抗体分子を従来法を用いて単離する。

これらの組成物を調製するのに有用な培養地は当分野でよく知られているもので市販もされており、これらには合成培養地、近交系マウスなどが含まれる。代表的合成培養地には4.5g/8グルコース、20mMグルタミンおよび20%ウシ

胎児血清を補ったダルベコ最小基質培地 (DMEM; ダルベコ (Dulbecco) 等, Virol. 8: 396 (1959)) がある。代表的近交系マウスにはB6 μ /c がある。

また、モノクローナル抗ポリペプチド抗体の生成法は自分分野でよく知られている。ナイマン (Niman) 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4949-4953 (1983) 参照。一般に、先に述べた抗CD14モノクローナル抗体生成操作における免疫原として1つ以上のLBPペプチドアナログを単独、もしくは免疫原キャリアーに結合して使用する。ハイブリドーマをLBPペプチドアナログおよびLBPと免疫反応する抗体産生能でスクリーニングする。適当な免疫文又反応を示すmAbによるCD14へのLPS-LBP複合体の結合を阻害能は実施例16の検定で調べる。

別の態様で本発明の治療法には治療効果量のLBPペプチドアナログ、好ましくは第1表で示した配列を有するアナログを投与することが含まれる。

敗血症の症状を示す患者はこれらの症状を予防または軽減する自分分野でよく知られた治療法の投与とその意思を要することができる。したがって本発明は敗血症の症状を予防または治療することが知られている機能的治療投与と實質的に同時に治療効果量の抗CD14抗体、抗LBP抗体、LBPペプチドアナログ、これらの組合せ物を投与することに関する。たとえば、抗TNF抗体および、またはTNFアンタゴニストを使用するなど直接的または間接的に敗血症におけるTNFの役割を阻害することが敗血症の症状を阻止または軽減し得る。特に、トレーシー (Tracey) 等 (Nature, 330: 682-684 (1987)) によって報告されているものに対応するTNFに対する免疫特異性を有するモノクローナル抗体など活性成分として抗TNF抗体を使用することが好ましい。

同様に、本発明の治療法は、さらにコルチゾール、ハイドロコルチゾンなどのステロイドによる實質的に同時の治療を含み得る。

通常、敗血症の症状を示す患者は抗生物質、一般にはゲンタマイシンなどのアミノグリコシドまたはペニシリンやセファロスポリンなどのベータラクタムで治療する。したがって殺菌量の抗生物質を投与するとと實質的に同時にここで述べている治療効果量の抗CD14抗体、抗LBP抗体、LBPペプチドアナログ、これらの組合せ物を投与する事が好ましい治療法である。“殺菌量”という語句

は治療を受けた患者においてバクテリアを死滅させる血中濃度に達するのに十分な量を意味する。

一般に、ヒトへの投与に関して安全と認識される抗生物質の投与量は自分分野でよく知られており、これもよく知られているように抗生物質の種類や治療するバクテリア感染のタイプによって異なる。

好ましい態様において本明細書で述べている抗CD14抗体、抗LBP抗体、LBPペプチドアナログ、またはこれらの組合せ物の投与は抗生物質の投与から約48時間以内、好ましくは約12-36時間以内、最も好ましくは實質的に同時に行なう。

本発明を実施するのに有用な抗生物質には既知デスクレファレンス、ハフ (Huff), B. B. 編, メディカルエコノミーカンパニー, オラデル, N. J. (1989) に述べられている処方の抗生物質、抗菌物質および抗真菌剤がある。他の態様において本発明は治療効果量のCD14、好ましくはLPS-LBP複合体を結合するその可溶性部分を単独もしくは治療効果量の抗TNF抗体、抗LBP抗体および抗生物質と単独または組合せて投与することに関する。CD14をコードするcDNAおよびこれから誘導されるアミノ酸配列は自分分野でよく知られている。ゴヤート (Goyert) 等, Science, 239: 497-500 (1988)、フェレロ (Ferrero) 等, Nuc. Acids Res. 18: 4178 (1988) およびバジル (Basil) 等, Eur. J. Immunol., 16: 1583-1589 (1986) 参照。

C. 治療組成物

さらに本発明は本発明の治療法を実施するのに有用な治療組成物に関する。本治療組成物には混合物として医薬的に許容可能な賦形剤 (キャリアー) および活性成分として本明細書で述べている抗CD14抗体、抗LBP抗体およびLBPポリペプチドアナログのうちの1つ以上が含まれる。好ましい態様においてこの組成物にはLPS-LBP複合体のCD14への結合を阻害し得る抗CD14 mAbが含まれる。好ましいmAbは80bであり、より好ましいものには3C10がある。

他の好ましい態様における組成物には、LPS-LBP複合体のCD14への結合を阻害する抗LBP抗体、好ましくはmAbが含まれる。第1表に示した配

列を有するLBPペプチドアナログと免疫反応する抗LBP抗体を含む組成物が特に好ましい。

また好ましい態様の1つにはCD14への結合に関してLPS-LBP複合体へのアンタゴニストとして働くLBPペプチドアナログが含まれる。本発明の組成物に使用する上で好ましいLBPペプチドアナログは第1表に示した配列を有するものである。

さらに、好ましい治療組成物には以下の活性成分: 抗生物質、ステロイドおよび抗TNF抗体およびTNFアンタゴニストのうちの1つ以上が含まれる。代表的処方以下に示す。

(処方A)

成分	投与量 (mg/ml)
ゲンタマイシン (硫酸塩)	4.0
抗CD14 (mAb 3C10)	1.0
重碳酸ナトリウム USP	3.2
EDTAナトリウム塩 USP	0.1
注射用水 q. s. s. d.	1.0 ml

(処方B)

成分	投与量 (mg/ml)
抗TNF抗体	1.0
抗CD14 (mAb 3C10)	1.0
重碳酸ナトリウム USP	3.2
EDTAナトリウム塩 USP	0.1
注射用水 q. s. s. d.	1.0 ml

(処方C)

成分	投与量 (mg/ml)
ゲンタマイシン (硫酸塩)	4.0

抗TNF抗体	1.0
抗CD14 (mAb 3C10)	1.0
重碳酸ナトリウム USP	3.2
EDTAナトリウム塩 USP	0.1
注射用水 q. s. s. d.	1.0 ml

別の態様において本発明は医薬的に許容し得るキャリアー中、CD14またはそのLBP結合可溶性部分を含む敗血症治療に有用な治療組成物に関する。さらにこの組成物には治療効果量の抗TNF抗体、抗LBP抗体および抗生物質のうちの1つ以上が含まれることが望ましい。

活性成分としてポリペプチドまたは抗体分子を含む治療組成物の調製は自分分野でよく知られている。一般にはそのような組成物は溶液やサスペンションなど注射可能な形で調製されるが、粉砕化、サスペンション化、錠体化に達した固体も調製し得る。またエマルジョンも調製される。活性治療成分を医薬的に許容可能な賦形剤には水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、やその組合せ物がある。さらに望ましい場合は活性成分の効果を高める緩衝剤またはエマルジョン剤、pH緩衝剤など少量の補助剤が含まれる。

ポリペプチドまたは抗体は中和した医薬的に許容可能な塩として治療組成物に処方される。医薬的に許容可能な塩には鹽付加塩 (ポリペプチドまたは抗体分子の遊離したアミノ基と形成される。) が含まれ、これはたとえば塩酸やリン酸などの無機酸または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸で形成される。また遊離のカルボキシル基で形成される塩は、たとえばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化鉄などの無機塩基およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基で調製することができる。

投与用のポリペプチドまたは抗体含有組成物は従来たとえば注射により静脈に単位投与量が投与される。本発明の治療組成物に関して使用する“単位投与量”という言葉はヒトに一回投与するのに適した物理的に独立した単位で、その各々

が必要とされる希釈剤、すなわちキャリアーまたはベヒクルと共に所要される治療効果を齎すと計算された所定量の活性成分を含むものを意味する。

この組成物は投与形式に適合する方法で治療効果が投与される。投与量は治療を受ける機体、活性成分を利用する機体の免疫系の能力および所要されるCD 14またはLPS-LBP複合体結合能の阻害または中和の程度に依存する。投与に必要とされる活性成分の詳細な量は宿主の判断に依存し各々の患者によって異なる。しかし通常の投与量範囲は1日当たり体重1キログラム当たり活性成分0.1~2.0、好ましくは約0.5~約1.0、より好ましくは1~数ミリグラムのオーダーでありそれらは投与の経路にも依存する。初期投与や二次投与に関する独自の投与形式も種々であるが初期投与について次の注射または他の投与法で1時間以上の間隔をあけて反復して投与するのが一般的である。それとは別に、血中に10ナノモル~10マイクロモル濃度が維持されるような連続的静脈内注入も使用される。

本明細書で使用している“pg”はピコグラム、“ng”はナノグラム、“μg”はマイクログラム、“mg”はミリグラム、“μg”はマイクロリットル、“mL”はミリリットル、“L”はリットルを意味する。

(実施例)

以下に示す実施例は本発明を説明するものであり、これを制限するものではない。

実施例1~11は単球/マクロファージ系統のヒト細胞が膜面上を動く細胞表面レセプターを介してLPS-LBP複合体を結合することを明確にした実験を示している。

実施例12は抗CD14抗体がLPS-LBP複合体のCD14への結合を特異的に阻害することを示している。

実施例13~15はCD14がLPS-LBP複合体と特異的に結合し、かつその結合がMO由来のTNF分泌を誘導することを示している。

実施例16は抗CD14mAbがヒト血液におけるLPS-LBP複合体が誘導するTNFの分泌を阻害することを示している。

実施例17は実施例1~16の結果のまとめおよび議論を提供している。

1. 試薬

精製したヒトの単球を培養することによって得た。単球の新鮮な単球は37℃で45分間、末梢血液単球細胞がたんぱく質コート化プラスチックに接着させることにより得た。PMNはイングリッシュ (English) 等、J. Immunol. Methods, 5: 249(1974)の方法により新鮮な血液から精製した。赤血球でロゼット形成させることにより精製したT細胞はJ. ミング (Ming) (ロックフェラー大学) から提供された。ヒトのヘルツの静脈内皮細胞層 (Lo) 等、J. Exp. Med. 169: 1779-1793 (1989)はS. K. (Lo) (ロックフェラー大学) 博士から提供された。ヒツジ赤血球 (E) はライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 156: 1149-1164(1982)に示された方法を用いてEGG (EGG) またはEGM (EGM) でコートした。

C3bは1.0% C5欠損ヒト血清 (シグマ) 1mL中37℃で30分間2~10×10⁶ のE1gMをインキュベートすることによりE1gMを付着させた。それからこの赤血球を洗浄し、ついで2.5mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むバッファ中、0℃で10分間インキュベーションした。生成したEC3bはEDTA耐性のMOとのロゼット形成による検定で示されるようにC3bを有していない。ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 164: 1876-1888(1986)に従ってEをLPSでコートした。調整に用いたLPS量を変化させてE LPS¹⁰ (1~10 μg/4×10⁶ E) またはE LPS¹⁰ (0.2~1 μg/4×10⁶ E) が生成した。等容量のE LPS¹⁰ (10⁶/mL) およびLBP 10 μg/mLを37℃、20分間インキュベーションすることによりE LPS¹⁰をLBPでコートした。生成したLBPコートE LPS (リガンドコートE) は洗浄し、直ちに使用した。

いくつかの実験ではEを別の方法でLBPコートした。まず5×10⁶ のEを0.1M炭酸ナトリウムpH9.2中5℃で20分間・250 μgのスルホ-NHS-ビオチンとインキュベーションすることによりEをビオチン化し、また50 μgのLBPを5 μgのスルホ-NHS-ビオチンとインキュベーションすることによりLBPをビオチン化した後PBSに於て透析した。このビオチン化したたんぱく質はストレプトアビジンブリッジを介してビオチン化Eに結合させた。洗浄した10⁶ のビオチン化E (EB) を20℃で30分間10 μgのストレプトアビジンとインキュベーションしてアビジンコート赤血球 (E BAV) を生成した。フルオレセイン化ストレプトアビジンを用いた予備実験はE BAVが吻

LBPは急性状態のウサギ血清から精製した (トピアス (Tobias) 等、J. Exp. Med., 164: 777-783(1986))。これは順色ゲル上では均一であると考えられる。抗ウサギLBPはヤギで調製した。MBPはR. A. B. エゴコビツ (Ezekowitz) 博士 (ボストン, MA) から提供された。脂質/遊走促進因子 (BPI) はJ. ガベイ (Gabay) 博士 (ニューヨーク, NY) から提供された。サルモネラミネソタ (*Salmonella minnesota*) のLPS (Re595 または野生型) はリストバイオリジカル (キャンベル, CA) から入手した。CD18に対するモノクローナル抗体 (mAb) 1B4およびFcγR III (CD16) に対するmAb、3G8はライト (Wright) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 5699-5703(1983) に報告されている。CR1に対するmAb 543は、R. シュレーパー (Schreiber) (セントルイス, MO) から提供され、FcγR IおよびFcγR IIに対するmAb 22およびVI、3はM. ファンガー (Fanger) (ハノーバー, NH) から提供された。パイロジェンフリーのヒト血清アルブミン (HSA) はアーマーファーマシューティカルズから入手し、また、パイロジェンフリーのPBSおよびDGV B¹⁰ はホワイテカーMAバイオプロダクツから入手した。NHS-ビオチン、スルホ-NHS-ビオチンおよびストレプトアビジンはピアスケミカルから入手した。

2. 装置

組織培養用プラスチック表面は20℃で1時間、LPS 1 μg/mLで25 μg/mLにたんぱく質 (抗体、LBPまたはHSA) または1 (μg/mL) とインキュベーションすることによってコーティングした。免疫複合体を形成するため、HSAコート表面をさらに30分間抗HSA抗体溶液 (1:50) とインキュベーションした。ある場合には、つづいてLPSコート表面を20℃で30分間、10 μg/mLのLBPで処理した。過酸化水素生成の検定のために全てのコート化表面を食細胞添加の前、1時間、1ミリグラム/ミリリットル (mg/mL) HSAで処理した。コート化した表面は検定前パイロジェンフリーのPBSで注意深く洗浄した。

3. 細胞

単球由来のマクロファージ (MO) はライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 156: 1149-1164(1982)に報告されている方法に従って3~10日間テフロンベーカー中で

強い蛍光性を有し、かつ凝集が見られないことを示した。洗浄した2.5×10⁶ 個のE BAVを20℃で30分間、25 μgのビオチン化LBPとインキュベーションしてE BAV-LBPを生成した。

ガラクトースの存在下または非存在下でサルモネラチフィリウム (*Salmonella typhimurium*) LT2 G₁₂ Eを増殖させ、それぞれ完全な、または短縮したLPSを含む細胞を得た。ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 164: 1876-1888(1986)。対数増殖培養物を洗浄し、フルオレセインでラベル化した後PBSで2×10⁶ /マイクロリットル (μL) に調整した。ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 164: 1876-1888(1986)。

4. 検定

LPSコート赤血球の凝集 (実施例3) は丸底マイクロプレート中21℃で30分間希釈LBP 10 μg/mL中の10⁶ 個のE LPS¹⁰を混濁することにより測定した。凝集は比濁パターンから読み取った。

MOへのリガンドコートEの結合をライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 156: 1149-1164(1982)の方法で検定した (実施例3)。簡単に云うとテラサキ (Terasaki) 組織培養プレートにHSAまたは他のたんぱく質でコートし (実施例2)、ついで3mMグルコース、0.5 mg/mL HSAおよび0.3 μg/mL プロテニン (シグマ) を含むPBS中の5 μLの細胞 (0.5×10⁶ /mL) を37℃で、45分間インキュベーションすることによりMOの単層を形成した。この単層にリガンドコートEおよび指示たんぱく質を添加した。Eを0℃、10分間かけて沈着させ、ついでそのプレートを37℃に15分間維持した。洗浄して未吸着のEを除いた後比濁法で吸着を測定した。ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 164: 1876-1888(1986)に示されているように37℃、15分間のインキュベーションを採用した同様の方法でフルオレセイン化サルモネラ (*Salmonella*) の結合を測定した。この結果は100個のMO当りのEまたはバクテリアの数を示す吸着指数として報告する。37℃で45分間MOをEとインキュベーションし、かつウェルを測定する前、低湿状態で簡単に乾燥することにより未吸着Eを分解すること以外は同様の方法により (ライト (Wright) 等、J. Exp. Med., 156: 1149-1164(1982)) リガンドコート化Eの食作用を測定した。

5. LBPは赤血球膜へ挿入したLPSに結合する。

0.5 μg / ml 程度のLBPのELPS¹¹への添加が凝集を起こした。リン脂質との疎水性相互作用によりEの膜へのLPSが分配されるので、この凝集結果はLBPがリビダの露出した親水性部分を認識し、かつ、LBPが多量体を形成する能力を有することを示している。ELPSは強く凝集せず、緩やかなビベディングで分散し得る。

6. LBPはELPSおよびサルモネラのマクロファージへの結合を増進する。

LPSと白血球上のセプターのCD18複合体とLPSとの相互作用を介してグラム陰性菌およびLPSコート化赤血球はMOと結合する。ライト(Wright)等、J. Exp. Med., 164:1878-1888(1986)。その相互作用を阻害するLBPの能力を調べた。最初の試験は高レベルのLPSで調製したEを使用した。これらのELPS¹¹はMOに強力に結合し、LBPの添加は結合をわずかに促進させた。この促進の性質を試験するため、低レベルのLPSでEを調製した。5マイクログラム/ミリリットル ($\mu\text{g}/\text{ml}$) LBPの存在化または非存在下でMOをELPS¹¹とインキュベーションした。ELPS¹¹はMOとほとんど結合しなかったが、LBPの添加で結合が劇的に促進された(第1図)。結合の増進は1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LBPで効果が最も大きくなる投与量依存性を示す。この効果の特異性は他の急性炎症反応、マンノース結合たんぱく質が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でもELPS¹¹のMOへの結合に影響せず、別のLPS結合たんぱく質BPIは10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でもその結合に影響せず。またポリクロナル抗LBP抗血清(1:200)がLBPによって起こるELPS¹¹のロゼット形成を20倍も減少させるという観察によって支持されている。

また、MOとELPSとの相互作用を促進するLBPの能力は赤血球膜中のLPS量に依存していた(第2図)。LBPはELPSとMOとの直接的相互作用を維持するのに必要な量よりも20~100倍も少ないLPS量で調製したEの結合を効果的に介介し得る。

短鎖型LPSを産生するグラム陰性菌の株(ラフ株)はMOと強力に結合するが、完全なLPSを有するスムーズ株はあまり結合しない。ライト(Wright)等、J. Exp. Med., 164:1878-1888(1986)。LBPはスムーズおよびラフLPSと等しく

良く結合するので[トビアス(Tobias)等、J. Biol. Chem., 264:10367-10371(1989)]スムーズサルモネラ(Salmonella)へのLBPのオプソニン作用を調べた。第2表のデータが示すように、LBPの添加がスムーズサルモネラ(Salmonella)のMOへの結合を数倍に促進させた。

第2表

LBPはサルモネラのMO¹への結合を促進する。

吸着指数

	スムーズS. テフィリウム	ラフS. テフィリウム
-LBP	273	1088
+LBP	1881	2,109

1. S. テフィリウム(Typhimurium) LT2のスムーズおよびラフ型菌はライト(Wright)等、J. Exp. Med., 164:1878-1888(1986)に報告されているようにガラクトースの存在下または非存在下でこの株のGa1E凝集体を増殖することにより得た。

マクロファージ単層へのバクテリアの結合は22.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLBPの存在下または非存在下で測定した。スムーズ型バクテリアのMOへの結合にLBPの添加は5.9 \pm 1.9 (n=4) 倍の増加を起した。第2表はLBPの添加もラフ型サルモネラ(Salmonella)の結合を促進するがその効果はオプソニン化していないバクテリアの強い結合によりスムーズ型S. テフィリウム(Typhimurium)で見られるものよりも著しく小さいことを示している。したがって、LBPは生きている本来のバクテリアのMOとの相互作用を促進させる。

7. MOはLBPのLPSとの複合体を認識する。

実験例8において、LBPをMOおよびELPSと一緒にした。LBPがMOまたはELPSと結合するかどうかを測定するため、細胞を別々にLBPとインキュベートし、洗浄後それらを合わせた。この実験を第3表に示す。

第3表

ELPSのLBPによる前処理はそれらの相互作用を促進するがMOには促進が見られない。

吸着指数

条 件	実験1	実験2	実験3
LBPなし	0	17	4
前処理ELPS ¹¹	820	715	942
前処理MO	5	21	18
LPS, ELPS ¹¹ 及びMOの3成分の混合物	828	520	788

1. 単層のMOへのELPS¹¹の結合は実験例4に示した方法で測定した(0.2 $\mu\text{g}/4 \times 10^5$ E)。ELPS¹¹またはMOを37℃で20分間5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で前処理し決定前に洗浄した。別に吸着決定の際に5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LBPを添加した。

ELPS¹¹のLBPによる前処理はコインキュベーション実験で観察されるものと同じ(データを示さず)投与・応答曲線に従ってMOへの結合を強く促進した(第3表)。この結果はLBPはELPSと安定に会合し、かつ表面に結合したLBPはMOによって認識されることを示している。一方MOの前処理はつくづくELPSの結合に影響しなかった(第3表)。

ELPS表面のLBPはLPSと複合体を形成する。LPSの非存在下MOがLBPと結合するかどうかを測定するため、LBPをビオチン化し、ストレプトアビジンコート化赤血球に結合した。生成したEBAV-LBPはMOとは結合しないが(第3図)、LPSの添加はELBPのMOへの強い吸着を引き起こした。ELBPの吸着を引き起こすのに必要なLPS量はE欠失LBPの吸着に必要な量よりも50倍も少ないことから(第3図)、LPSはLBPへの結合によりEBAV-LBPの結合を促進させるように思われる。さらに、LPS処理ELBPはCD18欠失MOに強く結合するが、ELPSはこれと結合しない。したがって、LBPはMOによって認識されるためにはLPSと複合体を形成しなければならぬ。

8. LBPは単核食細胞に限定される移動性レセプターによって認識される。

LBP処理ELPSは単核およびMOと實質的に100%結合する。このこと

は結合活性がこれらの集団の全てのメンバーに存在することを示している。LBPが他のタイプの細胞と相互作用するかどうかを決定するため、単層のPMN、T細胞、およびヘリの静脈内皮細胞をLBP処理したELPS¹¹とインキュベートした。結合は観察されなかった。同様に、たまたまMO調製物に混入したリンパ球がLBPコート化Eと結合することは決して観察されなかった。したがって、LBPコート化粒子を結合する能力は単核食細胞に限定された性質であると思われる。

LBPに対する特異的なレセプターの存在がLPSおよびLBPの複合体でコートした表面上にMOを吸着すること示された。第4表は表面結合したLBPはLBP処理したELPSの結合を強く低下させるがE18GまたはEC3b1の結合にはなんの影響も持たないことを示している。

第4表

LBPのレセプターは膜面中を移動する。

表面	ELPS ¹¹ LBP	ELPS ¹¹	EC3b1	E18G
HSA	833	607	915	621
HSA-抗-HSA	795	455	1051	45
IB4	848	149	200	253
LPS-LBP	147	828	1181	782

Lプラスチック表面を21℃で2時間HSA(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、mAb IB4(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)またはLPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)でコートし、ついで十分に洗浄した。指示されている場合は、抗-HSA(ウサギ抗HSA抗血清の1:40希釈物)またはLBP(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を加え、20℃で30分間インキュベートした。MOを37℃で45分間洗浄したコート化表面上に吸着させ、さらに洗浄した後、リガンドコート化赤血球を添加した。8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS/ 4×10^5 Eを用いてELPS¹¹を調製した。ELPS¹¹は実験例3に示したように0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS/ 4×10^5 Eで調製し、ついで5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLBPで処理した。示したデータは4回の実験の代表値である。

上述の結果はLBPが膜面中を移動する分子によって認識されることを示しており、このレセプターはCR3およびFcRとは異なることを示している。

8. LBPはCR3またはFcRとは相互作用しない。

LPSはCR3やCD18複合体の他のメンバー (LFA-1およびp150, 95) によって認識されることが知られているので (ライト(Wright)等, J. Exp. Med., 187:1878-1888(1988))、これらのレセプターと少量のELPSの相互作用を容易にすることによりLBPがELPSの結合を促進させるらしい。しかし、いくつかの観察結果はこの可能性を排除した。第V表の結果はLBPがCD18の先天性欠損患者2人から単離した単球へのELPSの強い結合を引き起こすことを示している。CD18欠損細胞は平行した検定でELPS'またはEC3b1とほとんど結合しなかった。

第5表

LBPはCD18欠損患者由来の単球へのELPS'の結合を仲介する。

検体	吸着指数		
	ELPS'	ELPS''	ELPS'+LBP
EC3b1			
コントロール1	108	31	232
129			
コントロール2	185	27	437
152			
患者1	17	15	394
患者2	5	14	529

1. 2人のCD18欠損患者の単球の単離 (CD18欠損白血球はインビトロでLPSに感応する) および2人の正常な成人コントロールをEC3b1, ELPS' (3 μ g / 4×10^6 E)、ELPS'' (1 μ g / 4×10^6 E)、とインキュベートし、その吸着指数を測定した。指示されている場合は、ELPS'に2.5 μ g / mlのLBPを添加した。

た。並行した実験でEC3b1の強いフィブロネクチンおよびPMA-刺激した食作用が示された。LBPが食作用が低いことの説明は単球表面のLPSの著しい傾方向への移動である。LPSはMOに吸着するEの極に“キャップ”をしてEの円周上のリガンドを不十分なものにし、シュードゴドに誘導する。このキャッピングを防ぐため、ビオチン化したLBPを第4図で示した方法でビオチン化したEたんばく質に結合させる。ここでも、このような結合を受けたEはEコート化したEたんばく質またはPMA刺激MOのいずれによっても貪食されることはなかった (貪食指数=0)。並行した実験では抗CD18 mAb (1B4) のビオチン化F(ab)₂によって容易に貪食されることが示された (貪食指数=4.82)。したがって、LBPのレセプターはそれ自身ではコート化赤血球の貪食作用を開始できない。

11. LBPのレセプターは酸化性破壊を開始しない。

LBPとそのレセプターの相互作用がMOからの細胞毒性活性を開始するかどうかを決めるため、コート化表面とMOとの相互作用の際の過酸化水素の生成を測定した。

コート化表面のMOの粒数の過酸化水素の放出をデラハルプ (de la Harpe) 等, J. Immunol. Methods, 78:323-338 (1985) の方法で測定した。簡単に云うと、3~4 $\times 10^6$ 個のMO (3日または4日目) をホースラディッシュペロオキシダーゼおよび4.2 mmole のスコポレチンを入れたたんばく質コート化組織培養ウェルに添加した。このプレートを37°Cでインキュベートし、間隔を置いて自動蛍光プレートリーダーを用いてスコポレチンの蛍光を測定した。3個のウェルの平均を結果としてウェル内に生成される過酸化水素のnmole数で表わした。コントロール刺激物、PMA (100 ng/ml) の添加ではテストした全てのコート化表面に関して同じ速度、同じ程度の過酸化水素の迅速な発生が起きた。

第5図は、LPSコート化表面へのMOの結合がわずかな過酸化水素の放出を起すことを示している (免疫複合体またはPMAによる刺激の1/2程度)。しかし、LBPでコートした表面は基底量以上の過酸化水素の放出はなかった。さらに、LPSコート化表面へのLBPの添加はLPSによる放出をブロックし、

LBP処理ELPS'の認識にCD18が関与している証拠はCD18を抗CD18 mAbでコートした表面に吸着することによりMOの頂点表面からCD18分子を放出させる実験から得られる。

Ma1B4はEC3b1およびELPS'の結合の減少によって示されるようにCD18分子を減少させるが、LBP処理ELPS'はこれらの細胞に正常に結合する (第4図)。最後にCa⁺⁺およびMg⁺⁺の欠失はEC3b1およびLPSのCD18複合体の結合を完全にブロックする (ライト(Wright)等, J. Exp. Med., 156:1149-1164(1982) およびライト(Wright)等, J. Exp. Med., 164:1876-1888(1985))。EDTA含有バッファにおけるLBP処理ELPS'の結合は等しかった。

LBP認識におけるFcレセプターの関与も除外された。E1gGの結合により決定されるように免疫複合体コート化表面の細胞の粒数がFcレセプターを著しく減少させる。しかし、LBPコート化ELPS'の結合は変化しなかった (第4図)。同様の実験で表面結合マンノース結合たんばく質、FcR1、FcR2、FcR3に対する表面結合mAbおよびCR1はLBPのMOへの結合に影響しないことが示された。これらのデータはLBPがCR1、CR3、FcRまたはマンノース結合たんばく質レセプターによって認識されないことを示している。

10. LBPのレセプターはFcレセプターの貪食作用を促進する。

既E1gGの添加はLBPコート化ELPS'のMOによる貪食作用を著しく強める (第4図)。最大の貪食作用の半分を起すのに必要な既E1gGの投与量は非コート化Eの貪食作用を起すのに必要な量よりも5倍も少ない。このようにLBPは貪食作用の誘導にE1gGと相乗的に作用するように思われる。先の報告に従うと (アレンバーガー (Allenberger) 等, J. Exp. Med., 145:357-371 (1977))、EへのEC3b1の吸着はE1gGに仲介される貪食作用を促進し、またこの促進度はLBPによるものと同等である (第4図)。

LBPのみに仲介される貪食作用も調べた。LBPコート化ELPSはMOときれいなロゼットを形成するが、結合したEはいずれも貪食 (第4図)、フィブロネクチン、またはPMA-刺激MOのどれによっても貪食されなかつ

た。このことはLBPがこの実験系でLPSと競争よく相互作用していることを示している。並行した実験でLBPまたはLPS+LBPコート化表面のMOの粒数がLBP処理ELPS'の結合を減少させることが示された。このことでLBPレセプターの結合が起きていることが示された。したがって、LBPレセプターは酸化性破壊を開始できないと考えられる。

12. 抗CD14抗体によるLPS-LBP複合体のMOへの結合の阻害。

MOへのLPS-LBP複合体の結合を阻害する3つの抗CD14 mAbの能力を測定した。単球のヒトMOを0°Cで15分間、それぞれ0 μ g/ml, 0.15 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1.5 μ g/ml, 5 μ g/ml, および15 μ g/ml濃度のmAb 3C10, 80bまたは2b1cとインキュベートした。この実験がLBP処理ELPS' (実験例3) と結合する能力を実験例4に示した方法で決定した。

第6図に示したこの実験結果は、mAb 3C10および80bは使用したmAb濃度を増加させるにつれ減少する吸着指数を示し、一方、mAb 3C10および80bが認識するものと異なるエピトープを認識するmAb 2b1cはコントロールmAb濃度 (0 μ g/ml) で得られるレベルより低い指数に減少させることはできない、すなわち結合を阻害することはできなかった。このようにmAb 3C10および80bはMOへのLPS-LBP複合体の結合を阻害する能力を有する。この阻害の特異性は、CD11b, CD18, CD16およびHLAに対する抗体は結合を阻害しないことによって支持される (データ未示)。

一方、第7図ではmAb 2b1c, 3C10および80bが全てMOへのLPS-LBP複合体の結合を減少させることを示している。MO単層を作る前にモノクローナル抗体を組織培養プレートに固定した。このことは、プレートに25 μ g/mlたんばく質/mAb濃度のmAbを加え、MOを接種する前に未結合のmAbをプレートから洗い落とすことによって行った。抗CD14 mAbでコートした表面に吸着したMOはLPS-LBP複合体でコートした赤血球の結合を減少させたが、他のmAbは減少させなかった。このように吸着したマクロマージの基底表面に再分布したCD14がLPS-LBP複合体の結合に必要であ

特表平5-501399 (9)

5. この結果はCD14がLPS-LBP複合体のレセプターとして働くという第6図の結論を確認している。

13. CD14はLPS-LBP複合体と特異的に結合する。

LPS-LBP複合体と特異的に結合する精製CD14の能力を測定した。表面をまず抗CD14 mAbでコートし、ついで単球のTriton X-100 抽出物でコートすることによりCD14をそれに固定した。10° 傾の単球を1% Triton PBS溶液に懸濁し、0℃で15分間インキュベーションした後不溶性物質を遠心で除いた。CD14を含む抽出物を抗体コート化表面と接触させた。この操作でCD14でコートした表面ができる。CD14以外の抗原に対する抗体を含むコントロールウェルではこの操作でCD14以外のたんぱく質でコートした表面ができる。十分洗浄した後LPS-LBP複合体でコートした赤血球をコート化ウェルに入れ、その赤血球(ELPS[®])の吸着を写真に撮った。LPS-LBP結合部位に対する結合部位をブロックしないCD14に対する抗体mAb 2b1cにより表面に吸着したCD14はコート化赤血球に強く結合した。他の抗原でコートした表面はこの活性を示さなかった。このように、精製したCD14分子はLPS-LBP複合体を結合する能力を有する。この結果でCD14がLPS-LBP複合体のレセプターとして働いていることが確認された。

14. LPS-LBP複合体はMOにおけるTNFの分泌を誘導する。

LBP、加熱処理LBP、ウシ血清アルブミン(BSA)またはウシ胎児血清(PCS)の存在下、腹腔渗出性マクロファージ(PEM)におけるTNF分泌を誘導するLPSの能力を測定した。

ウサギのPEMを得るため、NZWウサギ(2~2.5kg)にBCG(BCG細胞株、R-200、リビウム/ケムリサーチ社、ハミルトン、MT)由来の細胞を10μg含む35ミネラルオイル(ドラゲオール bVR、パンレコ、パトラー、PA)を腹腔内注射した。3日後、ペントバルビタールナトリウム(ウエスタンメディカルサプライ社、アルカディア、CA)120mgの静脈注射を行い、ついで2mM L-グルタミン、1mM ビルビン酸ナトリウム、50 U/50μg ペニシリン/ストレプトマイシン/ml、10mM ヘス、2%ウ

的に定量した。検定結果はU/mlで表わした。1ユニット(V)は50%の細胞を溶解するTNT量と定義する。

検定にはルーチンに8~12個のプレートを作る。各プレートには2つのコントロール、Re 595 LPS処理RAW 264.7細胞のならし培養地(8×10⁴ U/ml)およびRe 595 LPS処理ウサギPEMのならし培養地(1.3×10⁴ U/ml)を含めた。これらのコントロールはヒト細胞系TNF(シタス社、エミリービル、CA、2×10⁴ U/mg)に対して校正し、それに従って検定結果を標準化した。サンプルは4回検定し、その変動係数は0.12±0.08 (SD)であった。この検定法を用いて10pg/ml程度のウサギマクロファージ由来TNFが検出できる(比活性1×10⁴ U/mg)。しかし、10%以上の血清濃度はL929細胞の非特異的ラウディングおよび粘着のロスを起こすので、血清中のウサギTNFの検出限界は20 U/ml (0.2 ng TNF/mlに相当)である。第8図に示したこの実験結果は、LPSおよび活性LBPの両方が存在する場合のみTNFが生成されることを示している。Re 595 LPSはサルモネラ(Salmonella)のラフ株由来のものである。大腸菌O111B4由来のLPSなどスムーズ菌株から単離したLPSを用いた場合も同様の結果が得られ、このことはこの効果の一般性を示している。

15. LBPへのLPSの結合はLBPをトリプシン切断から保護する。

50mMヘス、10mMEDTA、pH7.4を含むバッファ中最終濃度0.3 mg/mlのLBPを含むサンプルを調製した。

1つのサンプルに対して最終濃度0.125 mg/mlとなるようにLPSを加えた。第2のサンプルには最終濃度が0.125 mg/mlとなるように硫酸デキストリンを加えた。つづいて3個全てのサンプルに最終濃度2 μg/mlとなるようにトリプシンを加えた。37℃に維持しながら、5、25、60および120分の時間間隔で部分標本を採取した。この部分標本は12%ゲルを用いたドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析した。第9図に示すこの実験結果は、LBPのLPSによる結合が酵素分解からLBPを保護することを示している。LPSは切断を防ぐLBPの構造変化または切断部位への立体障害を誘導することによりLBPを保護する。

シ給死血清、および5 U/mlヘリンを補った500 mlの水冷RPMI-1640による腹腔の無菌的洗浄を行った。収獲した細胞を遠心し(1000×G、10分、4℃)、をFBSを含まない上記培養地(無血清培養地)に懸濁した。さらに遠心と無血清培養地への懸濁を行った後、その細胞をヘモサイトメーターを用いて計数し、8~10×10⁴ マクロファージ/フラスコの密度になるように150 mlフラスコにプレATINGした。37℃、5%CO₂で2時間後、微しい洗浄と20 mlの無血清培養地の補充により非粘着細胞を除去した。ライト染色した細胞遠心製剤を用いて調べた時、ミネラルオイル誘導型の腹腔渗出性細胞には約60%のマクロファージ、35%の好中球、および5%の白血球が含まれていた。プレATINGと洗浄後、粘着細胞の90%以上がマクロファージとなった。このように生成したウサギPEMを12時間、先に示したたんぱく質の存在下および非存在下、サルモネラミネソタ(Salmonella einersota) Re 595から単離したLPS(100 pg/ml)で処理し、その細胞上清をマチソン(Matison)等、J. Clin. Invest., 81: 1925 (1988)に述べられているラフ(Ruff)等、Lymphokines, 2: 235-242 (1981)のL929検定法の修正法を用いて上述のようにTNFを検定した。

簡単に言うと、L929細胞(CCL1、アメリカンタイプカルチャーコレクション、ロックビル、MD)を10 mMヘスおよび10%ウシ胎児血清を補ったRPMI 1640 (ハイクロン、レバティン(Relativin) F. S., レヘステミカル社、フェニックス、AZ)で培養した。この集密培養物を5 mM EDTAおよび10 mMヘスを含有する生理食塩水中0.5%トリプシン(TRL3、ワーシントンバイオケミカル社、フリーホルド、NJ)溶液で簡単にすすぎ、アクチノマイシンD(1 μg/ml)を含む新鮮な培養地に懸濁した後96穴プレートに入れた(5~7×10⁴ 細胞/ウェル)。培養2時間後、順次希釈したサンプルをウェルに加え、そのウェルに0.2%クリスタルバイオレット、10%ホルマリンおよび0.01 Mリン酸pH 7~7.5からなる溶液を滴す。ついで水で十分洗浄した後ウェルを乾燥させた。読解度はIBM-PCコンピューターを備えたBio-TekモデルEL 310プレートリーダー(Bio-Tek インストルメント、バリンントン、VT)を用いて分光学

16. ヒト血液において抗CD14モノクローナル抗体はLPS-LBP誘導型のTNF生産を阻害する。

ヒト血液中において抗CD14 mAbがMOによるTNF分泌を阻害する能力をエスベイク(Espevik)等、J. Immunol. Meth., 95: 99-105 (1988)に報告されているTNF誘導性細胞毒性検定法を用いて測定した。簡単に言うと、ヘリンで抗凝集処理したヒト血液を調製し、37℃で30分間、最終濃度1 μg/mlとなるようなmAb 3C10、60 Bまたは1 B4とインキュベーションした。つづいて、この細胞を37℃、12時間、加温、10%CO₂インキュベーター中で最終濃度0、0.01、0.1、または1.0 ng/mlのRe 595-LPSとインキュベーションした。それから各サンプルの血漿を採取しTNFの存在を検定した。

これらの実験では、健康な供体の血液中の構成的LBPレベルが100~250 ng/mlと見られるため、さらにLBPを添加する必要はない。トビアス(Tobias)等、J. Exp. Med., 164: 777 (1988)およびトビアス(Tobias)等、Infect. Immun., 53: 73-76 (1985)。LBPに対するLPSのアフィニティーの見解もりに基づき、(トビアス(Tobias)等、J. Biol. Chem., 264: 10867-10871 (1989))、LBPの構成的レベルは添加した全てのLPSと結合するのに十分な量である。

WEH1クローン13細胞はトロント大学T. エスベイク(Espevik)から提供され、10%PCS、0.1 mMグルタミンおよび30 μg/mlゲンタマイシンを含むRPMI 1640培養培養地(ギブコ)で培養した。この細胞をRPMI 1640培養培養地100 μl中2×10⁴個となるようにマイクロプレートのウェルに接種した。ついでMO培養上清5~50マイクロリットル(μl)のサンプルをWEH1クローン13細胞培養培養地に加え、37℃で20時間インキュベーションした。つづいてPBS中5 mg/ml濃度のMTTテトラゾリウム(M-2128シグマケミカル、セントルイス、MO)10マイクロリットルを各ウェルに添加し、さらにそのウェルを37℃で4時間インキュベートした。ウェルから上清100マイクロリットルを吸引した後、0.04 NHCを含有するイソプロパノール100マイクロリットルを各ウェルに添加し

た。血清のホルマゲン結晶を溶解した後、そのプレートをテスト波長570nmおよび参照波長630nmを用いたマイクロプレートリーダーでプレートの測定を行った。

観測死細胞の割合は以下のように算出した。

$$100 - \frac{\text{CP/TNPを含むウェルの光学密度}}{\text{コントロールウェルの光学密度}} \times 100$$

実験培養で得られる死細胞の割合を種々の既知の濃度のTNPで得られた割合と比較して各実験培養中のTNP濃度を測定した。この実験結果を第8表に示す。

第8表

ヒト血球におけるLPS誘導TNF生産に関するモノクローナル抗体の効果。

(Re 595 LPS), ng/ml	抗体	(TNF), U/ml
—	—	<0.5
0.01	—	<0.5
0.1	—	4.8
1.0	—	3.8
—	3C10	<0.5
0.01	3C10	<0.5
0.1	3C10	<0.5
1.0	3C10	3
—	80b	<0.5
0.01	80b	<0.5
0.1	80b	2
1.0	80b	12
—	1B4	<0.5

CR1、CR3およびFcRに対する表面結合抗体はLBPコート化粒子の結合を減じないことからLBPのレセプターCD14は他のオプソニンレセプターとは異なる。

オプソニンとしてLBPはグラム陰性菌など敗血症誘発性感染体の除去を促進する。しかし、敗血症になった場合の菌分解は補体や分解性酵素を含む内在性分解システムの作用またはその後の抗生物質の作用によって起こる。分解はLPSの血中レベルの増加を起こす全身的なLPSの放出を誘導する。このレベルは1~1000pg LPS/mlと見られるので高アフィニティーのLPS-LBP複合体を形成するのに十分なLBPが存在する。[スターク(Stark)等、リムラスアメバサイト(Limulus Amebocyte) 凝集物テストによるバクテリア内毒素の検出、ワトソン(Watson) S. W. アラン(Alan) R. リス(Liss), NY 1987: 371-385] ヴァンデベンター(van Derent), S. J. H. Lancet 1: 605-606 (1988)。LPS-LBP複合体はマクロファージ/単球系統の細胞上のCD14に結合して、モノカインTNFの迅速な合成および放出を開始し、それによって完全な敗血症への進展に寄与する。

従来から知られているオプソニン、IgGはIgGコート化粒子の結合、それらの貪食作用的な取込みおよび過酸化水素などの毒性化合物の放出を可能にする。別のオプソニン、C3は基本的にC3コート化粒子の結合を可能にする。非刺激MOによる貪食作用はC3コート化粒子がIgGを有する場合のみ観察され(アーレンバーガー(Ahlenberger)等、J. Exp. Med. 145: 857-871 (1977)、かつ過酸化水素の発生は開始しない。ライト(Wright)等、J. Exp. Med. 158: 2016-2023 (1983)。

LBPのオプソニン活性はe3のものとは非常に異なる。LBPコート化粒子はMOに強く結合するが、その場合は貪食作用または過酸化水素の放出は開始しない(第5図)。またLBPは少量のIgGでコートした粒子の貪食作用を促進する上でC3に似ている(第4図)。LBPのオプソニン効果は唯一の点でC3と異なる。補体タンパク質はMOをPMA(ライト(Wright)等、J. Exp. Med. 158: 1149-1164 (1982))またはフィボネクチン(ライト(Wright)等、J. Exp. Med. 158: 1338-1343 (1983))などの補助

特表平5-501399 (10)

0.01	1B4	2
0.1	1B4	13
1.0	1B4	40

- 全てのモノクローナル抗体は最終濃度1μg/mlとなるように添加した。
- TNP検定は標準物質としてmgあたり2×10⁴ユニットの比活性を有する組換えTNFを用いたWEHIクローン13検定法で行った。
- 抗CD18mAb。

第8表からヒト血球中のLPS誘導TNF生産はLPS濃度の増加とともに増加することが分る。さらに、LPS-LBP複合体誘導TNF生産は抗CD14抗体3C10および80bによって有意に阻害されるが、抗CD181B4モノクローナル抗体はTNF生産を有意に阻害しないことが分る。スムーズ型バクテリア大腸菌0111:B4から単離したLPSで同じ実験を行ない、脱水化糖含量は異なるがリビドA構造は保存されているLPS類似物に関するその一般性が示された。

血球中に存在する細胞毒性のTNF特異性はマチソン(Matthison)等 J. Clin. Invest. 81: 1925 (1988) に述べられているようにポリクローナルな抗ヒトTNF IgG抗体を用いて確認した。この抗体はLPS処理血球サンプル中の全ての細胞毒性を完全に中和した。

17. 実施例1~16の結果に関する考察

これまで述べてきた事項はLPSがバクテリアに結合しオプソニンとして機能することおよびマクロファージによりその結合および貪食作用が容易になることを示している。LBPはBPIのLPS結合ドメインと相同的なドメインを介してLPSと結合する一方、LBPの細胞への吸着はLBPにユニークなドメインに仲介されると考えられている。

LPSコート化粒子表面上のLBPはMO上の膜面を移動する特異的レセプターCD14によって認識される。LBPコート化粒子はMOなどCD14発現細胞に結合するが他の血球細胞には結合しない。MOの頂点表面上の結合活性はLBP-LPS複合体でコートした基質上を細胞が拡散することにより消失する。

刺激物で処理した場合貪食作用を開始するが、LBPはそうのように刺激した細胞でさえ貪食作用を仲介しない。

オプソニンとして作用することによりLBPは動物体内においてグラム陰性バクテリアの拡散を制限する。急性状態におけるLBPの出現が感染との戦いにうまく適応する。それゆえ、LBPはグラム陰性菌などの感染体に対する防御システムを代表するものであると考えられる。

特定の態様および実施例を含むこれまでの明細は本発明を説明するものでありこれを制限するものではない。本発明の精神および範囲を逸脱することなしに多くの変形や修正が可能である。

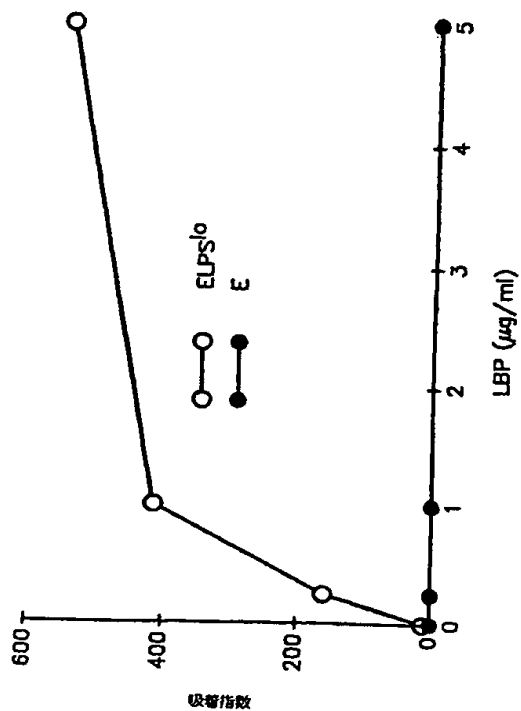


FIG. 1

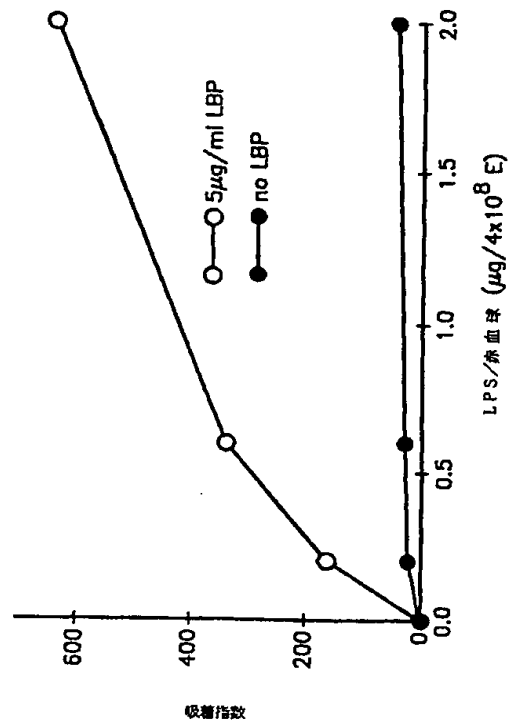


FIG. 2

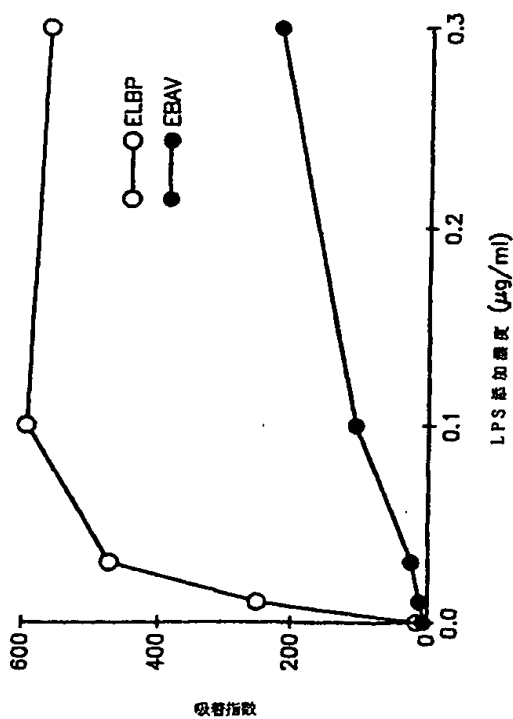


FIG. 3

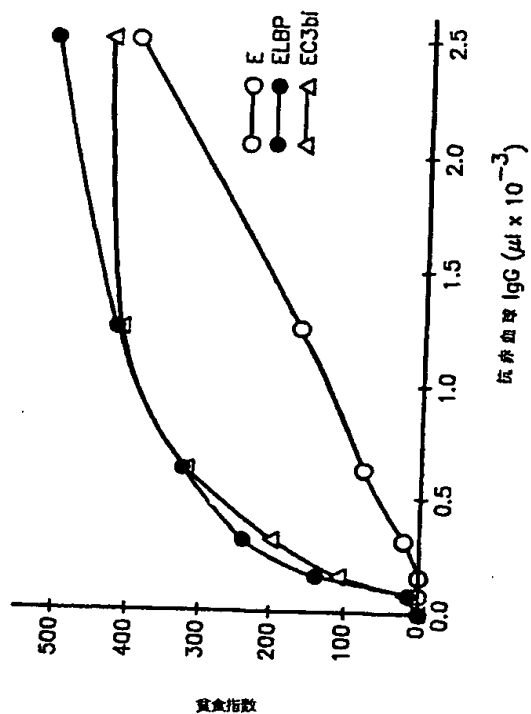
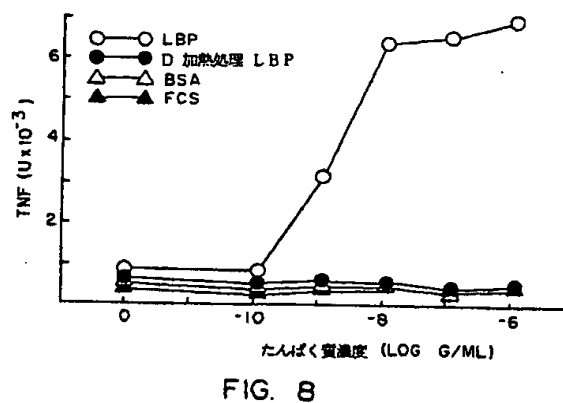
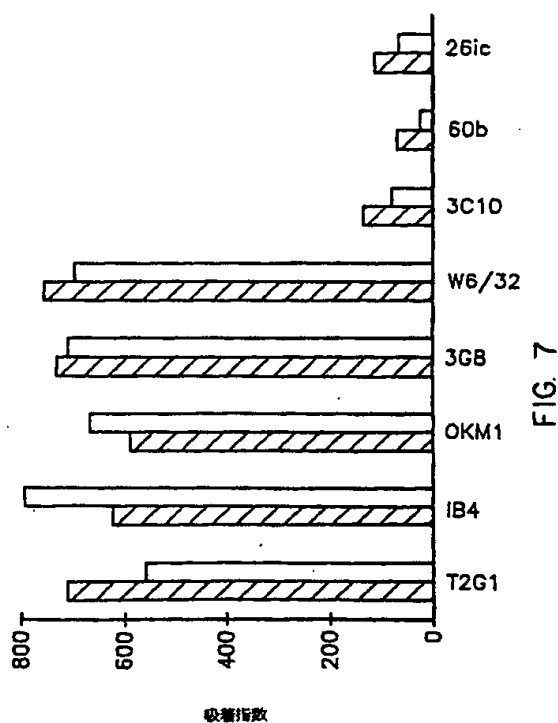
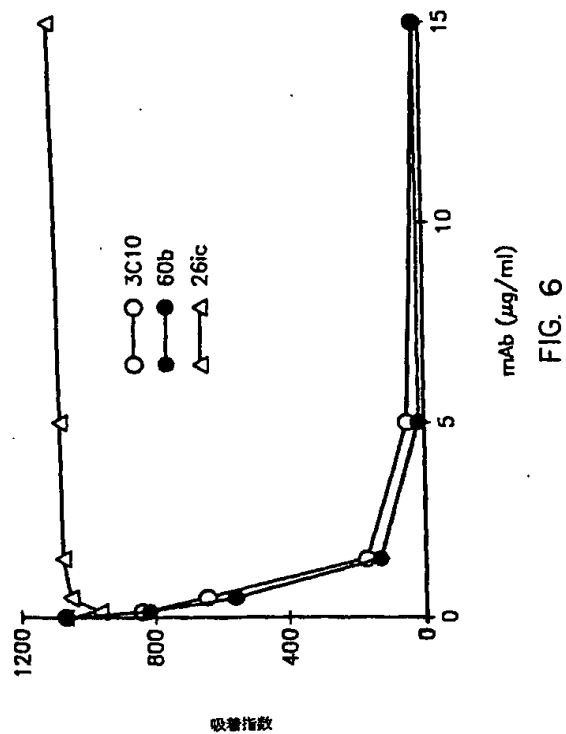
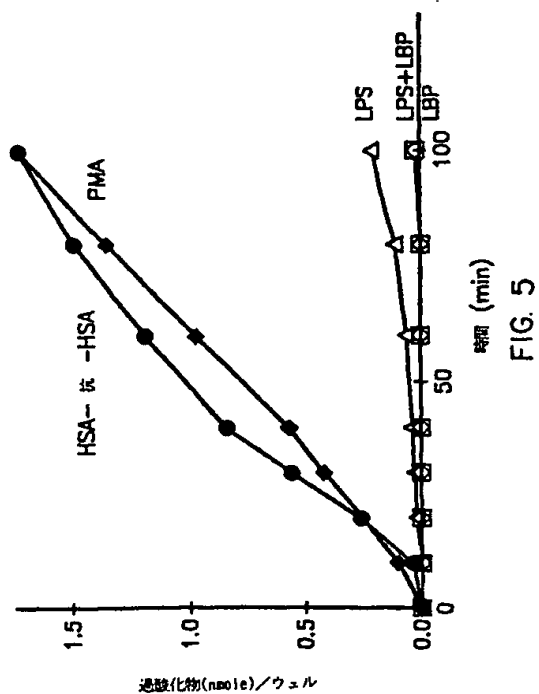


FIG. 4



Attachment to PCT/ISA/210
VI. Invitation

Group I, claims 1-9, 12-13, 20, 22, 24, drawn to a method of treatment for sepsis anti-CD14 antibodies and/or antibiotics. Should Group I be elected, a further election of species is required with regard to the four general types of sepsis-producing organisms listed on claims 8 and 9. In the absence of an election the species of claim 8 (gram-negative bacteria) will be examined along with claims 1-9.

Group II, claims 10-11, 21, 23, 25, drawn to a method of treating sepsis using anti-CD14 antibodies and anti-TNF antibodies, and/or antibiotics.

Group III, claims 14-16, drawn to a method of treating endotoxemia using anti-CD14 antibody.

Group IV, claims 17, 20, drawn to a method of treating sepsis using anti-LPS binding-protein antibody.

Group V, claims 18-19, drawn to a method of treating sepsis using a peptide analog of LPS binding protein.

The inventions listed as Groups I-V do not meet the requirements for unity of invention for the following reasons: Each group is drawn to a different combination of active agents or to different disease states, for instance Group I does not use anti-TNF antibodies, Group II does. Group II is drawn to a method for treating endotoxemia, a different disease state from the sepsis of Groups I, III, IV and V. Groups IV and V are drawn to methods of treatment using structurally different products antibodies or peptides. The anti-CD14 antibodies of Groups I, II and III appear to differ from the anti-LPS binding protein antibodies of Group IV.

第1頁の続き

②発明者	トービマス ピーター	アメリカ合衆国	カリフォルニア州	92024	エンシニタス	アーデン	ドライブ	564
②発明者	ライト サミュエル デー	アメリカ合衆国	ニューヨーク州	10021	ニューヨーク	ヨーク	アベニュー	6エヌ-1161
②発明者	マシソン ジョン デー	アメリカ合衆国	カリフォルニア州	92124	サン	デイエゴ	バグセラ	コート 4952
②出願人	ロツクフエラー ユニヴァーシ テイ	アメリカ合衆国	ニューヨーク州	10021	ニューヨーク	ヨーク	アベニュー	1230